

© Коллектив авторов, 2012
УДК 611.018.8:612.65:599.323.4

В. В. Порсева¹, В. В. Шилкин¹, М. Б. Корзина², В. П. Смирнова² и П. М. Маслюков²

ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НФ200⁺-НЕЙРОНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ УЗЛОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕГМЕНТАРНЫХ УРОВНЕЙ ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕАФФЕРЕНТАЦИИ

¹ Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В. В. Шилкин); ² кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. П. М. Маслюков), ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава России

Морфологические особенности нейронов, содержащих нейрофиламенты с молекулярной массой 200 килодальтон (НФ200⁺), изучали в чувствительных узлах грудного и поясничного спинномозговых нервов в течение 1-го года жизни крысы (n=80). Введение новорожденным крысам капсаицина (150 мг/кг) изменяло возрастную динамику НФ200⁺-нейронов, что проявлялось уменьшением количества и средней площади сечения этих нейронов в обоих узлах. Сегментарные различия заключались в большем снижении числа НФ200⁺-нейронов в чувствительном узле поясничного спинномозгового нерва в ранние и поздние сроки жизни.

Ключевые слова: нейрон, чувствительный узел грудного спинномозгового нерва, чувствительный узел поясничного спинномозгового нерва, нейрофиламенты 200 килодальтон, капсаицин

Установлено, что рецепторы болевой чувствительности гетерогенны. Один тип рецепторов — TRPV1 (ваниллоидные, VR1) — чувствителен к капсаицину, теплу и низкому значению pH [2, 6, 7] и образован С-волоками нейронов чувствительных узлов [1, 9, 10]. Другой тип ноцицепторов представлен свободными древовидными нервными окончаниями миелиновых Аδ-волокон, которые возбуждаются высокоинтенсивными механическими и термическими стимулами. Их маркером служит белок нейрофиламентов с молекулярной массой 200 килодальтон (НФ200) [3, 14, 18]. Известно, что после введения новорожденным крысам капсаицина наблюдаются изменения в нейронах чувствительных узлов, волокна которых формируют VR1 [2, 9, 18]. Данные о возрастных особенностях нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов различного сегментарного уровня, содержащих белки нейрофиламентов, включая НФ200, в норме и под влиянием капсаицина до настоящего времени отсутствуют.

Целью настоящего исследования явилось изучение морфометрических особенностей развития нейронов чувствительных узлов грудного и поясничного спинномозговых нервов крысы, содержащих белок НФ200, в условиях деafferентации, вызванной капсаицином.

Материал и методы. Исследование проведено на 80 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60, 90, 180 и 360 сут после рождения с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Животные были разделены на 2 группы: контрольную (n=40) и подопытную (n=40). У крыс подопытной группы на 2-е сутки жизни моделировали деafferентацию путем однократного подкожного введения 150 мг/кг капсаицина (N-vanillylonanamide, Sigma, США) в растворе, состоящем из 1 части 96% этилового спирта, 1 части Твин-80, 8 частей 0,9% раствора NaCl. Морфометрические характеристики нейронов, содержащих НФ200, изучали в чувствительных узлах II грудного и IV поясничного спинномозговых нервов. Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг внутривенно) путем транскардиальной перфузии изотонического раствора NaCl с гепарином (5 ЕД/л), затем 4% раствора параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (PBS). Выделенные узлы фиксировали в течение 2 ч в таком же фиксаторе, после чего промывали 3-кратно в изотоническом растворе NaCl на PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 20 мкм.

Для выявления нейронов, содержащих НФ200⁺, применяли меченые мышиными антителами (Abscam, США) при разведении 1:1000. Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритона X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубиро-

Сведения об авторах:

Порсева Валентина Вячеславовна (e-mail: vvporseva@mail.ru), Шилкин Валентин Викторович (кафедра анатомии человека); Корзина Марина Борисовна, Смирнова Виктория Павловна, Маслюков Петр Михайлович (e-mail: trpt@yua.ac.ru), кафедра нормальной физиологии с биофизикой ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия», 150000 Ярославль, ул. Революционная, 5

ли со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом CY3 (Jackson, США), дающим красную флюоресценцию в течение 2 ч (разведение 1:100).

Для расчета доли иммунопозитивных нейронов производили мечение всей нейронной популяции красителем Neuro Trace Green (Molecular Probes, США) с зеленой флюоресценцией. После промывки в PBS срезы инкубировали в этом растворе в течение 20 мин (разведение 1:200)

Анализ препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Микмед 2, вариант 12 (ЛОМО, Россия) с соответствующим набором светофильтров и CCD-камеры MDC320 (ScoreTec, Китай). На цифровых изображениях гистологических препаратов узлов при увеличении 200 по программе Image J (НИН, США) оценивали площадь нейронов и подсчитывали их на площади 100 мкм² с помощью квадратно-сетчатой вставки. Долю иммунореактивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100. Анализу подлежали нейроны, у которых срез прошел через ядро с хорошо видимым ядрышком, а флюоресценция значимо превышала фоновую. Статистический анализ включал определение среднего арифметического и его стандартной ошибки. Сравнение количественных показателей проводили с использованием t-критерия Стьюдента и различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. У контрольных животных всех исследованных возрастных групп в чувствительных узлах спинномозговых нервов изученных уровней выявлялись НФ200⁺-нейроны. Популяция нейронов, содержащих этот структурный белок, имела яркую красную флюоресценцию, интенсивность которой с возрастом животного не менялась. Свечением обладали волокна и цитоплазма тел иммунопозитивных нейронов, ядро оставалось неокрашенным (рисунок).

В процессе развития у крысы относительное содержание НФ200⁺-нейронов в чувствительных узлах менялось на обоих уровнях (табл. 1). Так, в узлах грудных нервов (УГН) доля НФ200⁺-нейронов к 10-суточному возрасту снизилась в 1,5 раза и была минимальной, после чего к 30-суточному возрасту увеличилась в 1,5 раза по сравнению с таковой в 3-суточном возрасте и стала максимальной, оставаясь на этих значениях до 90-суточного возраста. В последующем доля иммунопозитивных нейронов уменьшалась и к

Таблица 1

Относительное содержание НФ200⁺-нейронов в чувствительных узлах у крыс в контроле и при химической деафферентации капсаицином ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

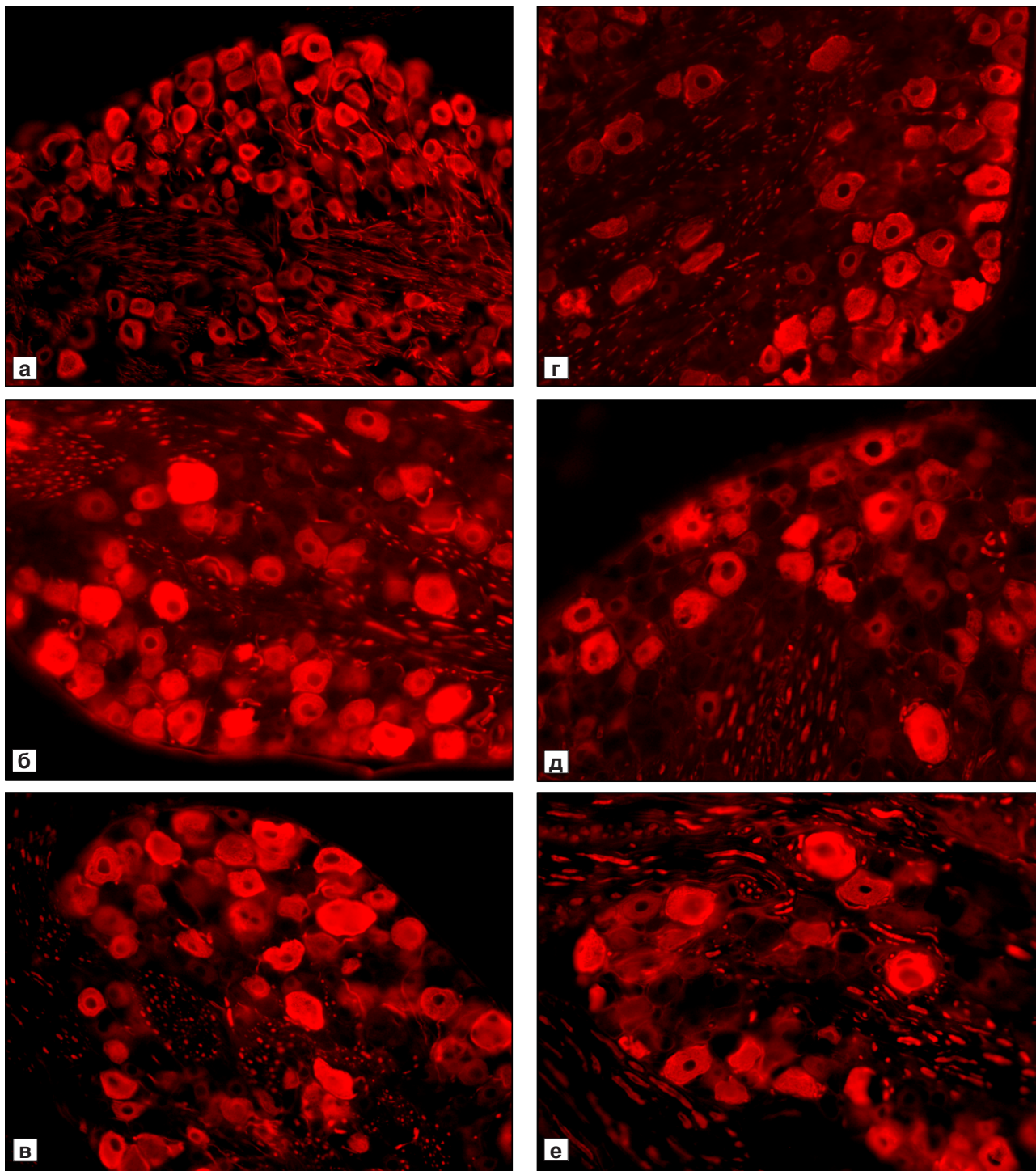
Возраст, сутки	Узлы грудных нервов		Узлы поясничных нервов	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
3-и	20,6±1,4	17,8±1,4	23,6±0,8	19,4±1,2
10-е	13,5±1,0*	13,3±0,8*	16,6±1,0*	10,1±0,5*,**
20-е	16,6±1,2	13,9±0,4*	14,8±0,6*	9,7±0,5*,**
30-е	30,4±1,7*	10,1±0,9*,**	28,2±1,4*	11,6±0,9*,**
60-е	27,6±1,5*	9,3±0,8*,**	30,5±1,8*	10,0±0,9*,**
90-е	29,0±1,8*	8,7±0,8*,**	29,1±1,7*	8,4±0,7*,**
180-е	22,4±1,2	8,0±0,3*,**	25,4±1,7	9,3±1,0*,**
360-е	19,5±1,2	10,6±0,8*,**	22,0±1,2	9,5±0,8*,**

Здесь и в табл. 2: * различия значимы по сравнению с показателями у 3-суточных крысят при $P < 0,05$; ** различия значимы по сравнению с контролем при $P < 0,05$.

Таблица 2

Площадь сечения НФ200⁺-нейронов в чувствительных узлах у крыс в контроле и при химической деафферентации капсаицином ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм²)

Возраст, сутки	Узлы грудных нервов		Узлы поясничных нервов	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
3-и	426±13	402±11	415±11	406±12
10-е	712±19*	686±15*,**	509±14*	493±14
20-е	870±19*	959±19*,**	842±19*	1126±33*,**
30-е	1018±31*	1368±31*,**	1034±21*	1134±32*
60-е	1245±32*	1022±25*,**	1368±44*	995±24*,**
90-е	1149±37*	987±24*	1258±39*	1046±35*
180-е	1041±24*	1046±37*	1209±34*	1008±28*,**
360-е	1340±34*	1191±33*,**	1431±48*	1010±25*,**



Нейроны, содержащие нейрофиламент с молекулярной массой 200 килодальтон в чувствительном узле грудного спинномозгового нерва в норме (а, б, г, д) и после введения капсаицина (в, е).

Возраст крыс: а — 3 сут; б, в — 30 сут; г — 20 сут; д, е — 360 сут. Иммуногистохимическая реакция. Об. 20, ок. 7.

концу наблюдения — в годовалом возрасте — не отличалась от таковой у 3-суточных крысят.

В узлах поясничных нервов (УПН) относительное содержание НФ200⁺-нейронов у крыс в 10-суточном возрасте также снизилось в 1,4 раза и продолжало снижаться до 20-суточного возраста, но в 1,6 раза превышало показатель у 3-суточ-

ных крысят. К 30-суточному возрасту доля иммунопозитивных нейронов увеличилась и достигла максимальных значений к 60-суточному возрасту, в котором превысила в 1,3 раза этот показатель у 3-суточных крысят. Повышенное относительное содержание иммунопозитивных нейронов оставалось до 90-суточного возраста, далее с возрастом

доля НФ200⁺-нейронов уменьшалась до уровня, сопоставимого с таковым в 3-суточном возрасте.

Таким образом, возрастные изменения количественного состава популяции НФ200⁺-нейронов были различными в чувствительных узлах исследуемых уровней только до 20-суточного возраста крысы. В последующих возрастных группах сегментарных различий не выявлялось: в 30-, 60- и 90-суточном возрасте количество иммунопозитивных нейронов в узлах было одинаковым, а в 180- и 360-суточном возрасте отмечалось снижение до значений, характерных для крыс 3-суточного возраста.

После введения капсаицина НФ200⁺-нейроны выявлялись в узлах обоих уровней у крыс всех исследованных возрастных групп. Характер флуоресценции в условиях опыта не изменился: яркое свечение сохраняли как волокна, так и цитоплазма тел нейронов.

Возрастная количественная динамика НФ200⁺-нейронов в УГН в подопытной группе характеризовалась значимым снижением их доли в 10-суточном возрасте по сравнению с таковой у 3-суточных крысят, в последующих возрастных группах относительное содержание иммунопозитивных нейронов практически не менялось. В УПН содержание НФ200⁺-нейронов так же значимо снижалось к 10-суточному возрасту и не менялось до конца наблюдения.

Как в УГН, так и в УПН значимо снижалась по сравнению с контролем доля НФ200⁺-нейронов с 30-суточного возраста крыс и до конца наблюдения. При этом в 3-, 10- и 20-суточном возрасте доля иммунопозитивных нейронов также была меньше, чем в контроле, но в УГН эти различия не значимы, в отличие от таковых в УПН. Таким образом, при моделировании дефицита афферентации на обоих уровнях происходило уменьшение популяции чувствительных НФ200⁺-нейронов, но имелись сегментарные различия, которые заключались в большем уменьшении числа иммунопозитивных нейронов в УПН в 360-суточном возрасте.

В контрольной группе животных средняя площадь сечения НФ200⁺-нейронов в течение 1 года наблюдения увеличилась в 3,1 раза в УГН и в 3,4 раза — в УПН (табл. 2). Для обоих уровней было характерным постепенное возрастное увеличение этого показателя до 60-суточного возраста, последующая относительная его стабильность до 180-суточного возраста и вновь повышение до максимальных значений к 360-м суткам жизни. Динамика прироста средней площади сечения нейронов была различной в зависимости от сегментарного уровня. Так, в УГН максимальный прирост площади наблюдался с 3-х по 10-е сутки

жизни и составил 40,9 мкм², в УПН — с 10-х по 20-е сутки и составил 33,3 мкм². Минимальный прирост средней площади сечения нейронов наблюдался с 30-х по 60-е сутки жизни и составил 7,6 мкм² в УГН и 11,1 мкм² — в УПН.

Возрастное изменение средней площади сечения НФ200⁺-нейронов после введения капсаицина выглядело иначе. Как в УГН, так и в УПН отмечалось прогрессивное увеличение средней площади сечения нейронов в течение 1-го месяца жизни крысы до максимальных значений, после чего этот показатель незначительно снижался и не менялся до конца наблюдения. В подопытной группе животных средняя площадь сечения НФ200⁺-нейронов в 3-суточном возрасте не отличалась от контрольных значений в узлах на обоих исследованных уровнях ($P > 0,05$) (см. табл. 2). В 20-суточном возрасте в подопытной группе средняя площадь сечения иммунопозитивных нейронов была значимо больше в контроле в 1,1 раза в УГН и в 1,3 — в УПН. В 60- и 360-суточном возрасте НФ200⁺-нейроны узлов обоих уровней в подопытной группе имели меньшие размеры по сравнению с таковыми в контрольной группе наблюдения ($P < 0,05$). Так, в УГН эта разница в уменьшении размеров в опыте была 1,1 и 1,2 раза соответственно, в УПН — 1,4 раза.

Таким образом, возрастное изменение средней площади сечения НФ200⁺-нейронов на обоих уровнях характеризовалось одинаковой динамикой развития, но различными периодами прироста параметра. У взрослых крыс средние размеры иммунопозитивных нейронов на поясничном уровне были больше, чем на грудном. Введение капсаицина нивелировало сегментарные различия размерных характеристик иммунопозитивных нейронов узлов и изменило динамику роста этих клеток.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования показали, что в процессе развития крысы лишь часть нейронов чувствительных узлов грудного (13,5–30,4%) и поясничного (16,6–30,5%) спинномозговых нервов содержали НФ200. Тем не менее, с возрастом доля НФ200⁺-нейронов в УГН и УПН менялась разнонаправленно только в первые 20 сут жизни животного. С 1-месячного и до годовалого возраста популяция НФ200⁺-нейронов обладала относительной стабильностью на обоих изученных уровнях и составляла от 20 до 30% всего нейронного состава. Сопоставление с результатами исследований других авторов, выполненных на взрослых животных, позволяет говорить о видовой специфичности данного нейронального маркера в чувствительных узлах. Так, НФ200 содержат

45% нейронов нижних грудных и верхних поясничных узлов у овец, 15% нейронов — нижних поясничных узлов у крыс [3, 11].

НФ200 в цитоплазме нейронов чувствительных узлов обоих сегментарных уровней распределялся равномерно, интенсивность свечения продукта реакции с возрастом крысы не менялась, флюоресценцией обладали и волокна, что является индикатором их миелинизации. У взрослых крыс НФ200⁺-нейроны УПН имели большую среднюю площадь сечения, чем нейроны УГН, что согласуется с данными литературы о нейронном составе исследуемых узлов [2, 3, 5, 12]. Популяция выявленных НФ200⁺-нейронов содержала у взрослых крыс клетки площадью сечения до 1200 мкм² (крупные) и более (очень крупные), что являлось характерным для обоих узлов и согласуется с данными других исследователей [3, 8].

Анализ ряда исследований показал, что введение капсаицина приводит к гибели нейронов чувствительных узлов независимо от их размеров [17] или же погибает популяция нейронов только малых размеров, которые и являются капсаицин-чувствительными [2, 9, 10]. Проведенное исследование показало, что после химической деафферентации капсаицином в чувствительных узлах также происходят возрастные изменения морфометрических и количественных характеристик НФ200⁺-нейронов. При моделировании дефицита афферентации капсаицином у крыс изменилось количество НФ200⁺-нейронов в узлах обоих уровней, что проявилось уменьшением числа иммунопозитивных нейронов уже в 3-суточном возрасте, у взрослых крыс доля потери клеточной популяции достигла максимума и затем вновь снизилась к годовалому возрасту. Введение капсаицина привело к уменьшению средней площади сечения НФ200⁺-нейронов в обоих узлах. Кратковременное увеличение площади сечения нейронов изученных узлов в подопытной группе, очевидно, объясняется внутриклеточным накоплением Ca²⁺ и Na⁺, что ведет к гидратации, активации протеаз, накоплению токсинов, дегенерации и гибели клеток [4, 16].

Установлено, что введение новорожденным крысам капсаицина вызывает гибель 20% клеток чувствительного узла грудного спинномозгового нерва на 10-е сутки жизни. Этот эффект сохраняется и во взрослом состоянии, при этом гибнет популяция нейронов малых размеров [2], которые и являются капсаицин-чувствительными, содержащими TRPV1. В настоящем исследовании показана гибель и более крупных чувствительных клеток, содержащих НФ200. Учитывая это и данные литературы о возможной солокализации

TRPV1 с рецепторами нейронов, содержащих НФ200 [15, 18], можно говорить о повреждении капсаицином чувствительных нейронов, имеющих как безмиелиновые С-волокна, так и миелиновые Аδ-волокна. В этом плане результаты проведенных исследований подтверждают данные литературы о реакции на повреждение периферического отростка именно НФ200⁺-нейронов [3, 8, 13].

Таким образом, при химической деафферентации капсаицином повреждаются и гибнут мелкие TRPV1⁺- и более крупные НФ200⁺-нейроны.

Работа поддержана РФФИ, гранты 08-04-00470, 10-04-00509; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотарев В. А. и Ноздрачев А. Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва. Рос. физиол. журн., 2001, т. 87, № 2, с. 182–204.
2. Порсева В. В., Шилкин В. В., Корзина М. Б. и др. Изменение TRPV1-иммунореактивных нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов крысы под влиянием капсаицина. Морфология, 2011, т. 139, вып. 3, с. 41–45.
3. Рагинов И. С. и Чельшев Ю. А. Посттравматическое выживание чувствительных нейронов различных субпопуляций. Морфология, 2003, т. 124, вып. 4, с. 47–50.
4. Спиридонов В. К. и Толочко З. С. Капсаицин-чувствительные нервы и окислительный стресс. Бюл. СО РАМН, 2010, т. 30, № 4, с. 76–81.
5. Сысов А. В. Количественная морфологическая характеристика поясничных спинномозговых ганглиев в постнатальном периоде развития. Морфология, 1996, т. 109, вып. 2, с. 94–102.
6. Clapham D. E. TRP channels as cellular sensors. Nature, 2003, v. 426, p. 517–524.
7. Gavva N. R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. Trends Pharmacol. Sci., 2008, v.29, p. 550–557.
8. Ferri G., Sabani A., Abelli L. et al. Neuronal intermediate filaments in rat dorsal root ganglia: differential distribution of peripheral and neurofilament protein immunoreactivity and effect of capsaicin. Brain Res., 1990, v. 515, № 1–2, p. 331–335.
9. Ma Q. P. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. J. Neurosci. Lett., 2002, v. 319, p. 87–90.
10. Piper A. S. and Docherty R. J. One-way cross-desensitization between P2X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurons. J. Physiol., 2000, v. 15, № 523, p. 685–696.
11. Russo D., Clavenzani P., Mazzoni M. et al. Immunohistochemical characterization of TH13-L2 spinal ganglia neurons in sheep. Microsc. Res. Tech., 2010, v. 73, № 2, p. 128–139.
12. Rybarova S., Kluchova D., Kocisova M. et al. Detection of peptidergic and nitrergic structures in the spinal ganglia of rabbits. Bratisl. Lek. Listy, 2000, v. 101, № 5, p. 280–287.
13. Sharon G. and Lasek R. Neurofilament protein synthesis in DRG neurons decreases more after peripheral axotomy than after central axotomy. Neuroscience, 1988, v. 8, № 5, p. 1739–1748.

14. Shaw G., Yang C., Ellis R. et al. Hyperphosphorylated neurofilaments NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, v. 336, p. 1268–1277.
15. Suzuki M., Watanabe Y., Oyama Y. et al. Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci. Lett.*, 2003, v. 353, № 3, p. 189–192.
16. Szolcsanyi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*, 2004, v. 38, № 6, p. 377–384.
17. Torsney C., Meredith-Middleton J. and Fitzgerald M. Neonatal capsaicin treatment prevents the normal postnatal withdrawal of A fibres from lamina II without affecting fos responses to innocuous peripheral stimulation. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 2000, v. 11, № 121(1), p. 55–65.
18. Yoshimura N., Erdman S. L., Snider M. W. and de Groat W. C. Effects of spinal cord injury on neurofilament immunoreactivity and capsaicin sensitivity in rat dorsal root ganglion neurons innervating the urinary bladder. *Neuroscience*, 1998, v. 83, № 2, p. 633–643.

Поступила в редакцию 21.10.2011
Получена после доработки 03.05.2012

PECULIARITIES OF AGE CHANGES OF NF200⁺-NEURONS IN THE SENSORY GANGLIA OF DIFFERENT SEGMENTAL LEVELS AFTER CHEMICAL DEAFFERENTATION

*V. V. Porseva, V. V. Shilkin, M. B. Korzina,
V. P. Smirnova and P. M. Maslyukov*

Morphological features of the neurons containing neurofilaments with molecular mass of 200 kD (NF200⁺), were studied in the sensory ganglia of thoracic and lumbar spinal nerves in rats (n=80) during the first year of their life. Capsaicin treatment (150 mg/kg) of the newborn animals resulted in the change of age dynamics of NF200⁺ neurons. This was reflected by a reduction of NF200⁺ neuron numbers and their cross-sectional areas in both ganglia. Segmental differences included greater reduction of NF200⁺ neuron number in the sensory ganglion of lumbar spinal nerve in both early and late developmental periods.

Key words: *neuron, sensory ganglion of thoracic spinal nerve, sensory ganglion of lumbar spinal nerve, 200 kD neurofilaments, capsaicin*

Department of Human Anatomy and Department of Physiology and Biophysics, Yaroslavl' State Medical Academy